











#7 attachment  
09/985689


**DIALOGWEB.**       


Guided Search [new search](#) [favorites](#) [settings](#) [cost](#) [logout](#) [help](#)

 Dynamic Search: JAPIO - Patent Abstracts of Japan

 Records for: JP 5211868 [save as alert...](#) [save strategy only...](#)

Output  Format:  Output as:  [display / send](#)

Modify  [refine search](#) [back to picklist](#)

 select [all](#) [none](#) Records 1 of 1 In full Format

☐ 1. 2/19/1  
04220168 PRODUCTION OF ALKALI PROTEASE

Pub. No.: 05-211868 [ JP 5211868 A ]

Published: August 24, 1993 (19930824)

Inventor: SHIBATA TOMOHIKO

MATSUDA HISAO

TSUTSUMI TAIRA

SUZUKI HIDEO

NIIMURA YOICHI

YAMAYA YOKO

Applicant: HOKKAIDO TOGYO KK [460599] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)

Application No.: 03-084324 [JP 9184324]

Filed: March 26, 1991 (19910326)

International Class: [ 5 ] C12N-009/52; C12N-009/52; C12R-001/64

JAPIO Class: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry)

Journal: Section: C, Section No. 1136, Vol. 17, No. 655, Pg. 83, December 06, 1993 (19931206)

#### ABSTRACT

PURPOSE: To provide an alkali protease for carrying out proteolysis in a low-temperature area, capable of utilizing for food processing, industry, detergent, etc.

CONSTITUTION: The objective alkali protease is produced by culturing a bacterial strain of the genus Xanthomonas capable of culturing at 10-20 deg.C, concretely, Xanthomonas sp. S-1 (FERM P-12087) in a nutrient medium. The alkali protease has activity even in a low-temperature area, though the optimum temperature is about at 40 deg.C.

JAPIO (Dialog® File 347): (c) 2001 JPO & JAPIO. All rights reserved.

©1997-2001 The Dialog Corporation -

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 5 - 2 1 1 8 6 8

(43) 公開日 平成 5 年 (1993) 8 月 24 日

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

C12N 9/52

//(C12N 9/52

C12R 1:64 )

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

7823-4B

審査請求 有 請求項の数 2 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平 3 - 8 4 3 2 4

(22) 出願日 平成 3 年 (1991) 3 月 26 日

特許法第 30 条第 1 項適用申請有り 平成 3 年 3 月 15 日 社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌 65 巻 03 号講演要旨集」に発表

(71) 出願人 000241968

北海道糖業株式会社

東京都千代田区神田神保町 2 丁目 1 番地

(72) 発明者 柴田 知彦

北海道網走市潮見 1 - 3 5 8 - 3 2

(72) 発明者 松田 久男

北海道中川郡本別町勇足 3 8 - 6

(72) 発明者 堤 平

北海道北見市北上 1 0 1 - 1 5

(72) 発明者 鈴木 英雄

北海道網走市南 7 条東 3 丁目

(74) 代理人 弁理士 田中 昭雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルカリプロテアーゼの製造方法

(57) 【要約】

【目的】 低温領域で、蛋白質分解を目的とする食品加工用、工業用、洗剤用等に利用可能なアルカリプロテアーゼを提供することを目的とする。

【構成】 10~20℃の温度領域で培養可能な菌株・キサントモナス属、具体的にはキサントモナス・エスピー(Xanthomonas sp.) S-1 (微工研寄託菌寄第12087号) を栄養培地にて培養することにより、至適温度は40℃前後であるが低温領域でも活性を有するアルカリプロテアーゼの製造方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 キサントモナス属の菌株を栄養培地にて培養し、培養物中にアルカリプロテアーゼを蓄積せしめ、該培養物からアルカリプロテアーゼを採取することを特徴とするアルカリプロテアーゼの製造方法。

【請求項 2】 キサントモナス属の菌株が、キサントモナス・エスピー (*Xanthomonas* sp.) S-1 (微工研寄託 菌寄第 12087 号) であることを特徴とする特許請求の範囲第 1 項記載のアルカリプロテアーゼの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、アルカリプロテアーゼの製造方法に関し、更に詳しくはキサントモナス属に属する微生物が生産する低温領域で活性を有するアルカリプロテアーゼの製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 アルカリプロテアーゼは、バチルス属、ストレプトマイセス属、アスペルギルス属等の微生物を利用して生産されるものが知られている。

【0003】 このアルカリプロテアーゼは、食品加工、洗剤、皮なめし (脱毛)、フィルムからの銀回収等かなり広い分野で利用されているが、近年洗剤を始めとして酵素を低温で有効に作用するアルカリプロテアーゼの生産が望まれており、またこの酵素が低温による培養で生産されることが期待されている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする問題点】 現在、より低温で活性を有するアルカリプロテアーゼとして市販されているアルカリプロテアーゼ (商品名 APJ-21: 昭和電工製) があるが、このプロテアーゼについても低温領域における洗浄力は必ずしも満足できるものでない。

## 【0005】

【問題点を解決するための手段】 本発明者らは、低温領域で充分な洗浄効果を有するアルカリプロテアーゼの生産、更に低温培養で効率よくアルカリプロテアーゼを生産させる方法について鋭意研究を重ね、広く自然界よりアルカリプロテアーゼ生産菌を検索した結果、キサントモナス属に属する菌株から低温領域で活性を有するアルカリプロテアーゼが得られることを見出し、この発明を完成するに至ったものである。

【0006】 即ち、従来の菌株では一般に酵素の生産は 30℃ 以上の培養温度が普通であるが、この発明のキサントモナス菌株は 10~25℃ の温度領域で培養され、15℃ の培養温度でアルカリプロテアーゼの生産が最大となり、低温領域で活性を有するアルカリプロテアーゼが得られる。

【0007】 この発明のアルカリプロテアーゼを生産する分離菌株の菌学的性質について、以下に示す。

## A. 形態的性質

肉汁寒天培地上で 30℃、2 日間培養した時、以下の形態

的特徴が観察された。

- |          |            |
|----------|------------|
| 1) 細胞の形  | : 桿菌       |
| 大きさ      | : -        |
| コロニーの大きさ | : 直径 0.5mm |
| 2) 運動性   | : 有り       |
| 3) 孢子    | : 形成されない   |
| 4) グラム染色 | : 陰性       |

## 【0008】 B. 生理的性質

- |                      |       |
|----------------------|-------|
| 1) 硝酸塩の還元            | : -   |
| 10 2) インドール生成        | : -   |
| 3) アルギニンデヒドラーゼ       | : -   |
| 4) ウレアーゼ             | : -   |
| 5) $\beta$ -ガラクトシダーゼ | : -   |
| 6) オキシダーゼ            | : -   |
| 7) カタラーゼ             | : +   |
| 8) ゼラチンの加水分解         | : +   |
| 9) ツィーン 80 の加水分解     | : -   |
| 10) OF テスト           | : -   |
| 11) 生育の温度範囲          | : 37℃ |
| 20 12) グルコースからの酸生成   | : -   |
| 13) マルトースからの酸生成      | : -   |
| 14) 糖類及び有機酸の消化性      |       |

グルコース	: +	カプロン酸	: -
アラビノース	: -	マレイン酸	: +
マンニット	: -	クエン酸	: +
マルトース	: +	フェニル酢酸	: -
マンノース	: +	アジピン酸	: -
グルコン酸	: -		

【0009】 以上の菌学的性質からこの菌株は、キサントモナス属に属するとみなされる。したがって、本菌株をキサントモナス・エスピー (*Xanthomonas* sp.) S-1 と命名し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した。寄託番号は微工研寄託 菌寄第 12087 号である。

【0010】 この発明に使用する微生物としては、上記キサントモナス・エスピー (*Xanthomonas* sp.) S-1 (微工研寄託 菌寄第 12087 号) が挙げられるが、この菌だけに限らずキサントモナス属に属し低温領域でアルカリプロテアーゼを生産する菌は全てこの発明において使用することができる。

40 【0011】 この発明においてアルカリプロテアーゼを生産する培地としては、通常の微生物の培養に用いられるもので、本菌株に利用可能なものであれば良く、炭素源としてはデンプン、デキストリン、糖蜜、グルコース、無機塩としてはリン酸 2 ナトリウム、硫酸マグネシウム等の塩類や炭酸塩を加えてアルカリ性培地が好ましく、窒素源としては硝酸ナトリウム、尿素、有機窒素源等が使用される。

【0012】 培養温度は 10~25℃ の範囲にあり、好ましくは 12~17℃ である。培養 pH 7.0~9.0 の範囲にあり、好ましくは pH 8.2~8.7 である。但し、この条件

に限定されるものではない。培養は通常48～96時間培養することにより、培養液中にアルカリプロテアーゼが蓄積される。

【0013】培養終了後、培養液より遠心分離及び濾過などの一般的な固液分離手段により菌体及び不溶物を除いて粗酵素液を得る。このようにして得られた粗酵素液を硫酸塩析によりアルカリプロテアーゼを得る。このままで使用するか、更に透析、有機溶媒分別法、カラムクロマト等公知の精製法により精製しても良い。

【0014】得られたアルカリプロテアーゼの物理化学的性質は次の通りである。

a. 作用

アルカリ条件下で各種のタンパク質を分解する。

b. 至適 pH 及び安定 pH 範囲

至適 pH は 10.5～12 であり、安定 pH 範囲は相対活性 90 % 以上としたとき pH 7～12 である。

c. 至適温度と耐熱性

至適温度は 45℃ であり、30℃ の温度まで活性が維持される。更に、Ca<sup>2+</sup> 5mM 添加により、耐熱性は約 10℃ 向上する。

【0015】以上で明らかなように、この発明によれば比較的低温領域で活性なアルカリプロテアーゼをキサン

トモナス属の菌株より低温培養で効率よく生産することができる。

【0016】

【実施例】以下、実施例によりこの発明を具体的に説明する。

実施例 1

普通寒天培地にキサントモナス・エスピー (*Xanthomonas* sp.) S-1 (微工研寄託菌第 12087 号) を接種し、15℃ で 3 日間培養する。次にミルクカゼイン 1%、塩化カリウム 0.2%、硫酸マグネシウム 0.02%、グルコース 1%、酵母エキス 0.4%、リン酸 2 ナトリウム 1.2% を含む液体培地を 120℃ にて 20 分間滅菌した後、別途滅菌した 0.1M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.5) を容量比 0.25% 添加し、pH 8.5 の培養液を調製した。この培養液を 500ml 容振盪フラスコに 100ml 分注し、上記培養した種菌を 1 白金耳接種し、10℃、15℃、23℃、30℃ の各温度で 72 時間振盪培養した。24 時間ごとに pH、菌体濃度 (OD<sub>600nm</sub> の吸光値)、酵素活性を測定し、各培養温度での最大菌体濃度値及び最大酵素活性値を下記表 1 に示す。

20 【0017】

【表 1】

表 1

培養温度	最大菌体濃度値	最大活性値
(℃)	(A <sub>600</sub> )	(PU/ml)
10	6.0	285
15	5.8	370
23	5.2	160
30	5.1	43

【0018】なお、アルカリプロテアーゼの酵素活性測定方法は次の方法で行なった。30℃ に保温した 2% カゼイン溶液 (pH 10.5) 1.0ml に適宜希釈した酵素 1.0ml を加え 10 分間反応させた後、トリクロロ酢酸混液 4.0ml を加えて反応を停止させ、30℃ 20 分間放置し、東洋濾紙 No. 6 で濾別後、濾液 1.0ml に 0.4M 炭酸ナトリウム溶液 5.0ml を加え、これに 5 倍希釈したフォリン試薬 1.0ml を加えて 30℃ で 20 分間放置し、660nm の吸光度を測定する。前記条件下で 1 分間にチロシン 1 μg 相当量を遊離させる酵素量を 1 単位 (pu) とする。

【0019】以上表 1 に示した結果より明らかなように、キサントモナス・エスピー (*Xanthomonas* sp.) S-1 (微工研寄託菌第 12087 号) では培養温度 10～15℃ 程度の比較的低温の培養温度でアルカリプロテアーゼの最大活性値が得られた。

【0020】実施例 2

培養温度を 15℃ に設定する以外は実施例 1 と同じ条件で 6 本培養し、得られた培養液 480ml を遠心分離により除菌し、上澄液 460ml (350PU/ml) を得た。この上澄液に硫酸を加え 70% 飽和とし、アルカリプロテアーゼを析出さ

せ、遠心分離により塩析物を回収した。この塩析物を50 mMトリス-HCl 緩衝液(pH8.0) 5ml に溶解し、該溶液を透析膜に入れ、該緩衝液にて1夜透析し、15mlの粗酵素液(8.050PU/ml)を得た。この酵素を使用し、以下アルカリプロテアーゼの物理化学的性質を調べた。

【0021】(1) 作用(アルカリ条件下における各種蛋白質の分解率)

測定条件 pH : 10.5(10mM ホウ砂-NaOH 緩衝液)

温度 : 30℃

反応条件: 30分間

基質濃度: 1%

酵素量 : 30PU/ml

蛋白質分解率の測定は、アンソン-萩原変法に従い、各基質と所定の条件で反応させた後、直ちにBio-Rad のProtein Assay を用い蛋白質量を測定し、未反応分との比により分解率を求めた。その結果を下記表2に示す。

【0022】

【表2】

表2

カゼイン	ゼイン	大豆蛋白	ヘモグロビン
(%)	(%)	(%)	(%)
94.0	85.0	70.0	45.0

【0023】(2) 至適pH及び安定pH範囲

至適pHは、カゼイン1%を含む各pHの緩衝液に酵素を30PU/ml となるように加え、30℃で10分間反応させ、各pHにおける活性を測定することにより求めた。図1に至適pHでの活性を100とした時の各pHでの相対活性として示す。

【0024】また、安定pH範囲は各pHの緩衝液に酵素を210PU/mlとなるように加え、15℃で24時間インキュベートした後、30℃、pH10.5で活性を測定することにより求めた。図2にインキュベート前のpH10.5における活性を100とした時の相対活性として示す。なお、使用した緩衝液及びそのpH範囲は以下の通りである。

【0025】

pH範囲	緩衝液
pH 3~7	McIlvaine
pH 7~9	トリス-HCl
pH 9	ホウ砂-HCl
pH 10~12	ホウ砂-HCl

【0026】図1、図2から明らかなように、至適pHは10.5~12である。また、安定pH範囲は相対活性90%以上としたときpH7~12である。

【0027】(3) 至適温度及び耐熱性

至適温度は、基質として1%カゼインを含むpH10.5の緩衝液に酵素を加え、10分間各温度で反応させ、活性を測定することにより求め、至適温度での活性を100とした時の各温度との相対活性を図3に示す。

【0028】耐熱性は、50mMトリス-HCl 緩衝液(pH8.0)に210PU/mlの酵素を加え、各温度で3時間熱処理し、氷冷した後、30℃、pH10.5で活性を測定することにより求め、熱処理前のpH10.5における活性を100とした時の相対活性として図4に示す。

【0029】Ca<sup>2+</sup>塩添加(Ca<sup>2+</sup>塩添加量:5mM)による耐熱性の向上を下記表3に示す。

【0030】

【表3】

表 3

反応温度 (°C)	相対性 (%)	
	Ca <sup>2+</sup> 塩無添加	Ca <sup>2+</sup> 塩 5mM
4	100	100
10	100	100
20	100	100
25	100	100
30	98	100
35	66	96
40	50	88
45	5	77
50	0	54

【0031】図3、図4から明らかなように至適温度は45℃であり、30℃の温度まで活性が維持される。更に、表3に示すごとくCa<sup>2+</sup> 5mM添加により、耐熱性は約10℃ 30向上した。

#### 【0032】(4) 金属イオンの影響

下記測定条件の下で各緩衝液に一定量の本酵素液を加え、各種金属塩を1mM添加25℃恒温槽で1時間保温後、酵素の残存活性を測定し、金属塩無添加の活性を100としたときの相対活性を下記の表4に示す。

#### 【0033】測定条件

① pH : 7.0 (20mM トリス-HCl 緩衝液)  
 ② pH : 10.5 (10mM ホウ砂-NaOH 緩衝液)  
 温度 : 30℃  
 反応時間 : 10分間  
 基質 : 1% カゼイン溶液 (各緩衝液で調整)

#### 【0034】

【表4】

表 4

金属塩	相対活性 (%)	
	pH7.0	pH10.5
無添加	100	100
NaNO <sub>3</sub>	100	100
Ca(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	100	100
BaCl <sub>2</sub>	100	100
CoCl <sub>2</sub>	100	100
HgCl <sub>2</sub>	88	6
ZnSO <sub>4</sub>	100	100
CuSO <sub>4</sub>	100	100
MgSO <sub>4</sub>	100	100
FeSO <sub>4</sub>	100	100
MnSO <sub>4</sub>	100	100
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	88	100
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	13	92

【0035】表4より明らかなように、この発明に係る酵素液はpH7.0の条件で3価の鉄イオンに、pH10.5の条件で水銀イオンに強く活性を阻害される他は、他の金属イオンには活性を殆ど阻害されることはなかった。

【0036】(5) 阻害剤の影響

下記測定条件の下で20mMトリス-HCl緩衝液(pH7.0)にこの発明で得られた酵素液を加え、各阻害剤を所定濃度添加して25℃で30分間処理した後、酵素の残存活性を測定し、阻害剤無添加の活性を100としたときの相対活性を

下記表5に示す。

【0037】測定条件

pH : 7.0(20mMトリス-HCl 緩衝液)

温度 : 30℃

反応時間 : 10分間

基質 : 1% カゼイン溶液 (上記緩衝液で調整)

【0038】

【表5】

表 5

阻害剤	濃度 (mM)	相対活性 (%)
無添加	—	100
DFP	1	62
	5	28
PMSF	1	13
	5	10
EDTA-2Na	1	80
	5	76
PCMB	1	100
	5	97
TPCK	1	94
	5	81
TLCK	1	98
	5	93
HgCl <sub>2</sub>	1	87
	5	72

DFP : ジイソプロピルフルオロリン酸

PMSF : フェニルメタンスルフォニルフルオリド

EDTA-2Na : エチレンジアミンテトラアセテート-2Na

PCMB : パラクロロマーキュリー安息香酸

TPCK : トシルフェニルアラニクロロメチルケトン

TLCK : トシルリシンクロロメチルケトン

【0039】表5から明らかなように、この発明に係る酵素はセリンプロテアーゼ阻害剤のジイソプロピルフルオロリン酸 (DFP) やフェニルメタンスルフォニルフルオリド (PMSF) による活性の阻害が、金属プロテアーゼ阻害剤のエチレンジアミンテトラアセテート-2Na (EDTA-2Na) やSHプロテアーゼ阻害剤のパラクロロマーキュリー安息香酸 (PCMB) による活性の

阻害に比べ高いため、この発明に係る酵素は活性中心にセリン残基を持つセリンプロテアーゼであると推定される。

【0040】また動物のセリンプロテアーゼのキモトリプシンの阻害剤であるトシルフェニルアラニクロロメチルケトン (TPCK) 或はトリプシンの阻害剤であるトシルリシンクロロメチルケトン (TLCK) によって



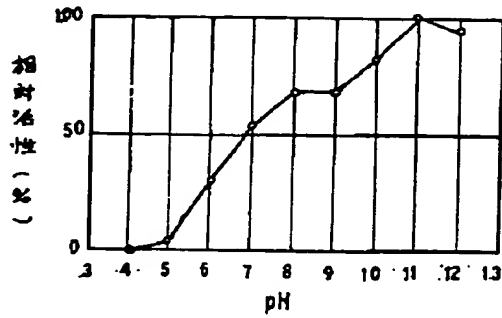
殆ど活性は阻害されないことが明かとなった。

【図面の簡単な説明】

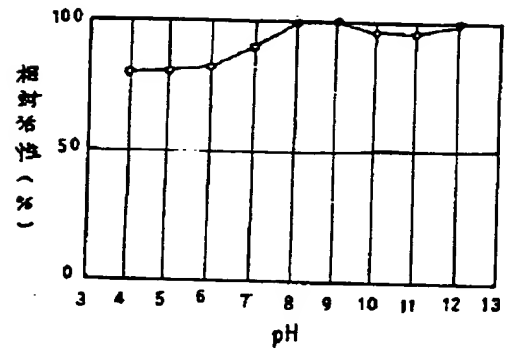
【図 1】実施例 2 で得られた粗酵素液の至適 pH を示す図

【図 2】実施例 2 で得られた粗酵素液の安定 pH 範囲を

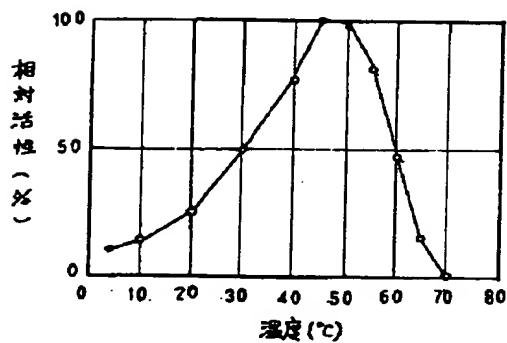
【図 1】



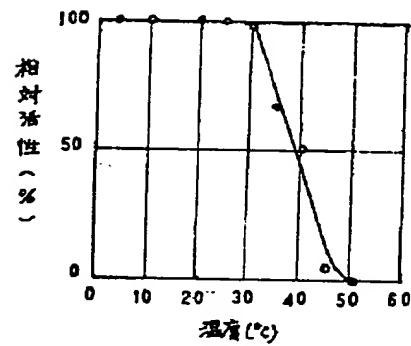
【図 2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

- (72) 発明者 新村 洋一  
北海道網走市駒場 5 - 7 1 - 1
- (72) 発明者 山屋 陽子  
北海道網走市南 5 条西 4 丁目